

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—20226

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 39/108

識別記号

庁内整理番号  
6408—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)2月1日

発明の数 4  
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ 動物用ワクチンおよびその製造法

98—155

⑮ 特 願 昭57—128872

⑯ 出 願 昭57(1982)7月26日

特許法第30条第1項適用 昭和57年4月2日  
社団法人日本獣医学会主催、第93回日本獣医  
学会「講演要旨集」に於て発表

⑰ 発 明 者 橋本喬

調布市上石原1—21—1

⑱ 発 明 者 久米常夫

茨城県北相馬郡藤代町大字清水

⑲ 発 明 者 陳清

台湾省台北県淡水鎮中正路32巷  
9号

⑳ 発 明 者 林再春

台湾省台北県淡水鎮中正路32巷  
3号

㉑ 出 願 人 北里研究所(社団法人)

東京都港区白金5—9—1

㉒ 代 理 人 弁理士 小林和憲

明 細 書

1. 発明の名称

動物用ワクチンおよびその製造法

2. 特許請求の範囲

- 1、豚の下痢症由来大腸菌の産生するエンテロトキシンおよびペロ細胞毒と絨毛を混合して不活化ワクチンとしたことを特徴とする動物用ワクチン。
- 2、豚の大腸菌性下痢症用ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン。
- 3、子豚の大腸菌性下痢症の予防のための不活化ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン。
- 4、エンテロトキシン(LTおよびST)およびペロ細胞毒を含む免疫原と絨毛(K88, K99および987P絨毛)を含む免疫原を等量に混合し、これにアルミニウムゲルを加えてなる特許請求の範囲第1項、第2項、第3項記載のワクチン。
- 5、エンテロトキシン(LTおよびST)およびペロ細胞毒産生大腸菌株を培養後遠心分離した

上清を無菌濾過し0.5%量になるようにホルマリンを加え、37℃24時間時々振とうしつつインキュベートして得られたエンテロトキシンおよびペロ細胞毒を含む免疫原と絨毛保有大腸菌株を培養後、PBS(リン酸緩衝食塩水)を加えて集菌し、濾過後 $5 \times 10^{10}$  CFU/mlの菌濃度の菌液を調製し、0.5%濃度にホルマリンを加えて37℃24時間時々振とうしつつインキュベートして得られた絨毛を含む免疫原とを、それぞれ等量に混合した後、6~7mg/mlにアルミニウムゲルを加えることを特徴とする動物用ワクチンの製造法。

6、分娩予定のほぼ1か月前の妊娠母豚に特許請求の範囲第1項記載の不活化ワクチンを1週間おきに2~3回皮下または筋肉内に接種して免疫し、分娩後の哺乳により初乳を介して子豚に抗体を得させしめることを特徴とする哺乳子豚の大腸菌性下痢を予防する方法。

7、不活化ワクチンにより免疫した母豚より初乳を介して感染防御抗体を受動的に受けた哺乳子豚にさらに離乳期前後に能動免疫することを特徴

とする子豚の大腸菌性下痢を予防する方法。

8、特許請求の範囲第1項記載の不活化ワクチンを投与することを特徴とする上記以外の時期における豚の大腸菌性下痢を予防する方法。

#### 8. 発明の詳細な説明

本発明は豚の大腸菌性下痢予防ワクチン、その製造法およびそれを用いた豚の大腸菌性下痢の予防法にかんする。さらに詳しくは豚の下痢症由来大腸菌の産生するエンテロトキシンおよびペロ細胞毒と線毛を混合してなる不活化ワクチン、その製造法およびこれを用いた豚、特に哺乳子豚の大腸菌性下痢の予防方法にかんする。

豚、特に哺乳期の子豚の大腸菌性下痢は高頻度で発生し、養豚経営に重大な問題である。

大腸菌による哺乳豚の下痢症の免疫についてはこれまでに多くの研究がなされている。

*Colibacillosis*の予防を目的としたワクチンはヨーロッパ諸国ではかなり古くから用いられてきた。この場合の多くのものは、自家ワクチンあるいは数種の検出頻度の高い血清型を混合した多価

ワクチンが用いられ、いずれも死菌ワクチンであつた。これらのワクチンではOまたはK抗原に対する抗体が感染防御に関与するとされ、実験的には主として検出頻度の高い血清型の株が免疫用抗原として用いられていた [Dam, A. (1968) *Nord. vet. Med.*, 20 449-457], Gay, c.c.s (1964), *Can. Vet. J.*, 5, 297-308]。しかし、これらのワクチンによる予防は必ずしも一定した成績の得られない場合が多いという欠点があつた。

近年毒素原性大腸菌の産生するLT (易熱性毒素) およびST (耐熱性毒素) が下痢因子として重視されるに至り、これを用いたワクチンに関する報告が次第に多くなっている。たとえば、LTワクチンを皮下または乳腺内に接種して免疫する方法 [Dobroescu と Huygelen (1973), *Zentralbl. veterinarmed.*, B, 20, 222-229], Dobroescu と Zgrnrich (1976) *Proc. pig. Vet. Sci.*, 1976 *Univ. Iowa, U.S.A.*] と LT<sup>+</sup>、ST<sup>+</sup>菌体ワクチンを用いて母子免疫し、20~30日齢の子豚にさらに能動免疫する方法 [Pesti, L.s (1976)

*Proc. Int. Pig. Vet. Soc.*, 1976 Cong., Iowa, U.S.A.] が、それぞれ有効であつたと報告されている。

このようにエンテロトキシンのうち、LTワクチンを用いたものが多いが、LT<sup>+</sup>、ST<sup>+</sup>株ワクチンでは強力な免疫が得られるが、LT<sup>+</sup>、ST<sup>-</sup>株を用いた場合には抗毒素の産生あるいは感染防御能も低かつたという報告もある [Klipstein, F.A.s (1981) *Infect. Immun.*, 32, 1100-1104]。

STを用いたワクチンについての報告も次第に多くなっている [Myers, L.L.s (1973), *Am. J. Vet. Res.*, 34, 29-33]。

ペロ細胞毒は、豚の下痢材料からしばしば分離され、下痢発生に何らかの役割を果たしているものと思われている。

近年感染の初期の段階における菌の表層構造と宿主組織の表面とのかかわり合いが重視されるようになり、とくに線毛がそれへの接合因子として注目されるようになった。

線毛保有株をワクチンとして用いた例としては、K 99と987P線毛を用いたものがあり [Morgan,

R.L.s (1978), *Infect. Immun.*, 22, 771-777]、その有効性が確認されたが、異種の線毛保有株に対しては感染を防御せず免疫学的にはそれぞれの線毛の特異性が証明された。

他方、線毛保有株の線毛を精製したワクチンを母豚の免疫に用い、初乳を介して子豚を免疫したところ、子豚はその攻撃をよく防御したという報告もある [Nagy, B.s (1978), *Infect. Immun.*, 21, 269-274]。

これらのエンテロトキシンまたは線毛を用いたワクチンのほか生菌ワクチンとして0.04%ホルマリン加弱毒ワクチンの母豚経口投与による免疫が有効であるといわれている [Wilhou と Svendsen (1971), *Am. J. Vet. Res.*, 32, 891-898, その他]。

以上のように、従来知られている哺乳豚の大腸菌性下痢症に対するワクチンは、(1)検出頻度の高いO抗原型を用いた多価ワクチン、(2)LTまたはSTを用いたエンテロトキシンワクチン、(3)K88, K99または987Pなどの線毛を用いた線毛ワ

クチンの三つに要約できる。

しかしながら、上記(1)の検出頻度の高いO抗原型を用いた多価ワクチンは、必ずしも一定した予防効果が得られない場合が多いといわれ、人の場合と異り、家畜下痢症からいわゆる病原性大腸と呼ばれている特定のO抗原大腸菌が分離されることはまれであり、家畜の下痢症の場合、検出頻度の高いO群を特定することが困難であるので、従って、家畜の大腸菌性下痢症には必ずしも有効でない場合が多かった。

また、(2)LTまたはSTを用いたエンテロトキシンワクチンは、LTまたはSTの関与する下痢症の場合についてはともかく、一般の家畜大腸菌性下痢症には必ずしも全て有効であるとは限らない。

更に(3)K88、K99または987Pなどの線毛を用いた線毛ワクチンは、これらの三線毛がそれぞれ抗原性が異なり、かつそれぞれの線毛保有菌株が家畜の大腸菌性下痢症に分布していることから、従来のこれら線毛の単独を使用したワクチン

は効果が必ずしも高いとは云えなかつた。

これまでの大腸菌に関する研究の進歩のうちある過程では、LTまたはSTエンテロトキシン保有菌株は、上述のいずれかの線毛をもっていることが多いとされ、従って、これらエンテロトキシン(LTまたはST)と線毛、さらにペロ細胞毒を混合する必要性は思いもよらないことであつた。ところがエンテロトキシンの産生性と線毛の保有とは必ずしも深い関連のないことは下表に示すごとく本発明者らの調査研究の結果からも明らかであり、従って、全ての大腸菌性下痢症に有効なワクチンは、これらを全て保有しなければならないであろうことが示されている。

エンテロトキシン、ペロ細胞毒および線毛の関係

毒素 (エンテロトキシンおよびペロ細胞毒)		線 毛			
組み合わせ	検出菌株数	K88	K99	987P	K99+987P
LT <sup>+</sup>	23	1	2	2	
ST <sup>+</sup>	8			3	
VT <sup>+</sup>	3				
LT <sup>+</sup> ST <sup>+</sup>	1				
LT <sup>+</sup> VT <sup>+</sup>	1				
LT <sup>+</sup> ST <sup>+</sup> VT <sup>+</sup>	2	6	14	6	
LT <sup>-</sup> ST <sup>-</sup> VT <sup>-</sup>	26				
計	64	1	6	19	6

註 LT<sup>+</sup> 易熱性エンテロトキシン産生性

ST<sup>+</sup> 耐

VT<sup>+</sup> ペロ細胞毒

LT<sup>-</sup> ST<sup>-</sup> VT<sup>-</sup> いずれも非産生

さらに本発明者らの野外における哺乳豚の大腸菌性下痢症の発生状況の調査により、分娩後1週

間以内の下痢の発生がほとんどであることから、この時期における免疫学的予防が最も重要であることが判つた。

また、従来報告されている線毛保有菌株に頻度の高いO抗原型の存在 [Olsson, B. (1980), Proc. Int. Pig Net. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, P 143]、ST保有株の多くがK99線毛をもつこと [Gontrepolis, M. (1979) Rec. Med., Vét., 155, 553-558]、K88線毛保有株にLT毒素産生株が多いこと [Renault, L. (1980), Ann. Rech. Vét., 9, 427-432]などは本発明者らの調査(前出表参照)では必ずしもそうではなく、O・K血清型、エンテロトキシン産生性、線毛保有株などの間には直接の関連性がないことが判つた。

さらに、従来の報告ではK88線毛保有株は豚下痢症由来株に多く、K99線毛は牛下痢症由来株に多いとされていたが、本発明者らは必ずしもそうではなく987P線毛を含めて、これらのすべてが免疫原として必要であることを見出した。

本発明は、このような知見に基づいて完成されたものであり、その目的は、豚仔に哺乳子豚の大腸菌性下痢予防のためのワクチン、その製造法およびそれを用いた豚仔に子豚の大腸菌性下痢の予防方法を提供することにある。

本発明において使用されるエンテロトキシンは、易熱性毒素(LT)および耐熱性毒素(ST)であつて、豚の下痢症由来大腸菌(O-5, O-153株など)によつて産生される。ペロトキシン産生大腸菌株としてはO-112株などがある。また、絨毛保有株としては、大腸菌株V-50, O-126, O-72株などがあげられる。

これらの大腸菌株は、本発明者らが、大腸菌性下痢症から分離したE.coli O-5(受託書、「微工研菌寄第6615号、FERMP-6615」)、E.coli O-72(受託書、「微工研菌寄第6614号、FERMP-6614」)、E.coli O-112(受託書、「微工研菌寄第6613号、FERMP-6613」)、E.coli O-126(受託書、「微工研菌寄第6612号、FERMP-6612」)、E.coli O-153(受

託書、「微工研菌寄第6616号、FERMP-6616」)およびCentral Veterinary Laboratory, Weybridge, Englandから分与されたV-50株である。

エンテロトキシン(LTおよびST)およびペロ細胞毒産生大腸菌の培養は、通常の毒素産生性の良い培地として多用されている培地例えばRvans変法培地などを用いて行うことができる。絨毛保有大腸菌を培養する培地としては、通常の絨毛の発育をよくする培地であればよく、例えばMinca変法培地などをあげることができる。

これら前記毒素や絨毛の不活化は、ワクチンの不活化に通常使用されるホルマリンなどによつて行われる。

ワクチンの効果を高める補助物質として、公知の効果増強物質、たとえばアルミニウムゲルを加えることも推奨される。

本発明において使用される豚の大腸菌性下痢予防ワクチンの製造法の一態様を述べれば以下の通りである。

エンテロトキシン(LTおよびST)およびペ

ロ細胞毒産生株をRvans変法培地で37℃24時間振とう培養(ほぼ $3.0 \sim 4.5 \times 10^{10}$  O.F.U./mlの菌数となる)後、8000 r.p.m 45分遠心分離した上清を0.45  $\mu$ mのミリポアフィルタで濾過後、0.5%にホルマリンを加え、37℃24時間ふ卵器におき、ときどき振とうしてエンテロトキシンおよびペロ細胞毒を含む免疫原を得る。他方、K88, K99および987Pなど絨毛保有株をMinca変法培地に37℃24時間培養後、PB8を加えて集菌し、ガーゼで濾過後 $5 \times 10^{10}$  O.F.U./mlに菌濃度を調整し、0.5%にホルマリンを加えて37℃ふ卵器に24時間置き、ときどき振とうして絨毛を含む免疫原を得る。

次いで、上記2種の免疫原をそれぞれ等量に混合した後、6~7%にアルミニウムゲルを加えて不活化ワクチンを調製した。

このようにして調製された本発明のワクチンの使用例の態様を述べれば以下の通りである。

分娩予定のほぼ1か月前の妊娠母豚に本ワクチンを1週間おきに2~3回皮下または筋肉内に接

触して分娩後の哺乳により初乳を介して子豚に抗体を得させることができる。

このような大腸菌性下痢予防方法の別法としては、分娩予定のほぼ1か月前の妊娠母豚を前記不活化ワクチンで免疫(1週間おきに2~3回皮下または筋肉内注射)して、分娩時の初乳中の抗体を子豚が哺乳することにより初乳を介した感染防御抗体を受動的に受けた哺乳子豚の抗体の持続は3~4週間であるので、この時期の子豚に能動免疫(1週間おきに2~3回、皮下または筋肉内とくに経口的に投与)を与えるという方法を挙げることができる。

また、このワクチンは哺乳子豚ばかりでなく、疫学的に大腸菌性下痢症の発生が疑われる場合、とくに幼若豚を中心に育成中のあらゆる豚への応用も考えられる。

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はけつしてそれのみに限定されるものではない。

#### 実施例1

1 エンテロトキシンおよびペロ細胞毒産生菌用培

特開昭59-20226(5)

地: Evans, D.G. (Infect. Immun., 7, 873-880, 1973) の培地に 0.25% のグルコースを加えた。

Evans 変法 (液体) 培地を用いた。その組成は下記のとおりである。

カザミノ酸 (Difco Lab.)	2.00 g
イーストエキス ( " )	1.5 g
食塩 (関東化学 KK)	2.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.05M) ( " )	8.71 g
グルコース ( " )	2.5 g
微量塩溶液*	1.0 ml
蒸留水	1000 ml
pH	8.5

\* 微量塩溶液の組成

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (関東化学 KK)	1.00 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (和光純薬工業 KK)	1.0 g
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O ( " )	0.135 g
GaCl <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O (関東化学 KK)	0.4 g
蒸留水	1000 ml

2. 線毛ワクテン生産用培地 : Guinea, P.A.M.

ら (Infect. Immun., 15, 676-678, 1977) と Graaf, P.K. (Infect. Immun., 27, 216-221, 1980) による Minca 培地に 0.1% のイーストエキス (Difco Lab.) と 1% の Iso-Vitalex (BBL) を加えた Minca 変法寒天平板培地を用いた。その組成は下記のとおりである。

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (関東化学 KK)	1.36 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O ( " )	10.1 g
グルコース ( " )	1.0 g
カザミノ酸 (Difco Lab.)	1.0 g
イーストエキス ( " )	1.0 g
寒天 ( " )	12.0 g
微量塩溶液*	1.0 ml
Iso-Vitalex (BBL)	10.0 ml
蒸留水	(無菌的に加える) 1000 ml
pH	7.5

\* 微量塩溶液の組成は Evans 変法培地の場合と同様である。

3. エンテロトキシンおよびペロ細胞毒の生産 : 前記 1 の割合で作った Evans 変法 (液体) 培地 200

ml を 500 ml の長頸コルベンに入れ、15 ポンド 15 分高圧滅菌する。この培地にこれらの毒素産生株 (O-5, O-153, O-112 株) の各々の種培養 (内径約 1.0 × 高さ約 9.0 cm の小試験管を用いた市販されている BBL 社のトリプチケースノイ寒天斜面培地に 20~24 時間 37℃ 培養) から 2~3 エーゼつつを移植して、24 時間、37℃ 恒温槽で振盪培養すると 3.0~4.5 × 10<sup>10</sup> O.F.U./ml の菌濃度となる。この菌液を 8000 r.p.m. 45 分遠心分離 (100 ml 容の遠心管使用) した上清を 0.45 μm のミリポアフィルターで濾過 (90 mm ステンレスフィルターホルダーを使用、加圧) 後、それぞれの菌株を等量に混合した (操作中の損失があり、概ね各株の上清は 150~170 ml となる)。このようにして 450~510 ml のエンテロトキシンおよびペロ細胞毒が得られるので、これに 0.5% にホルマリンを加え、37℃ のふ卵器に 24 時間置き、ときどき振盪した。さらにアルミニウムゲルを 6~7 mg/ml の割合に加えて、これを不活化ワクテンとして用いた。

4. 線毛ワクテンの生産 : 前記 2 の割合で作った Minca 変法寒天平板培地を 15 ポンド 15 分間滅菌後、Iso-Vitalex (BBL) を無菌的に加え、内径約 7.6 mm × 高さ約 1.5 mm のシャーレに 20 ml づつ 10 枚のシャーレに分注する。この培地に前記 3 の種培養から 1 エーゼつつを培地面に塗布し、37℃、24 時間ふ卵器に静置して培養する。各株 10 枚づつのシャーレを用いる。培養後 PBS をシャーレ 1 枚に 3~5 ml づつ加えて集菌し、滅菌ガーゼで濾過し (各株 30~50 ml の濃厚菌液を得る)、5 × 10<sup>10</sup> O.F.U./ml になるように菌濃度を McFarland または OD メーターを用いて PBS で調整し、その各々 (V-50, O-126, O-72) の菌液を等量づつ混合し、これに 0.5% にホルマリンを加え、37℃ ふ卵器に 24 時間置き、ときどき振盪して不活化する。これにさらにアジュバントとしてアルミニウムゲルを前記 3 と同じ割合で加え、これを不活化線毛ワクテンとした。

5. 用法 : 実験的には 3.4 のワクテンをそれぞれ

単独または等量に混合して用いた。

### 実施例2

本発明の不活化ワクチンの効果を示す実験例について以下に述べる。

妊娠母豚をエンテロトキシン(LTおよびST産生株)とペロ細胞毒(VT産生株)抗原あるいは線毛(K88, K99および987P線毛保有株)抗原または両抗原を混合した本発明の不活化ワクチンで免疫し、分娩後の哺乳子豚に経口的に攻撃して感染防御試験を行つた(第1表)。

エンテロトキシンとペロ細胞毒抗原によつて免疫した母豚から生まれた子豚は初乳を介してエンテロトキシンおよびペロ細胞毒産生株の攻撃によく耐える移行抗体を受け、下痢を発症しないが、免疫母豚の初乳を飲ませなかつた人工乳の子豚ではその攻撃を防御することができなかった。

一方、線毛ワクチンによる免疫母豚から生まれた子豚についてもほぼ同様の成績であつたが、エンテロトキシン産生株の攻撃に対しては防御できなかった。

この型の大腸菌性下痢症にも耐え得た。

すなわち、本発明のワクチンには2種の免疫原(抗原)が含まれている。一つはエンテロトキシン(LTおよびSTを含む)とペロ細胞毒よりなる免疫原であり、他の一つは線毛(K88, K99および987Pを含む)を免疫原とするものである。

このワクチンの特徴は、これら2種の免疫原を同時に用いることであり、それぞれ単独での免疫効果は望めないとの前記実験的根拠によるものである(第1表)。

さらに、これらの感染防御試験の成績を要付けるよう寒天ゲル内比降反応によつてエンテロトキシンおよびペロ細胞毒での免疫により低いながらLT, STおよびVT抗体の産生を認め、免疫した母豚から生まれた子豚の結紮腸管ループでの攻撃試験でSTに対する何らかの防御物質が初乳を介して哺乳子豚に伝達されていることなどが確認できた。

また、一方の線毛ワクチンで免疫した母豚血清、初乳乳清、哺乳子豚血清などには免疫に用いたK88, K99および987Pなどの線毛に対する抗線毛凝集価の上昇が認められた。

これらの実験結果から、エンテロトキシン単独または線毛ワクチン単独では豚の大腸菌性下痢症を完全に防止することはできず、またエンテロトキシンにおいてはLTとSTとは抗原性が違い、三線毛もそれぞれ抗原性が特異的であるので、それぞれの単独では完全な効果は期待できない。

それに反し、本発明の混合ワクチンを投与された母豚から母乳を介して免疫を受けた子豚はいず

第1表

エンテロトキシン(LT, ST)およびペロ細胞毒(VT)、線毛(K88, K99, 987P)、その両者の混合などを免疫原とした母子免疫による感染防御試験

免疫母豚番号	免疫原	初乳での哺乳	子豚番号	攻撃菌株	攻撃後における下痢の発生						
					6	12	18	1	2	3	4
1	エンテロトキシン (LT ST VT)	+	1	A	---	---	---	---	---	---	1/8
			2	A	---	---	---	---	---	---	1/8
			3	O	---	---	---	---	---	---	1/8
			4	O	---	---	---	---	---	---	1/8
		-	5	D	+	+	+	+	+	+	1/8
			6	D	+	+	+	+	+	+	1/8
			7	A	+	+	+	+	+	+	1/8
			8	A	+	+	+	+	+	+	1/8
			9	O	+	+	+	+	+	+	1/8
2	線毛 (K88 K99 987P)	+	10	A	+	+	+	+	+	+	1/8
			11	A	+	+	+	+	+	+	1/8
		+	12	D	---	---	---	---	---	---	1/8
			13	D	---	---	---	---	---	---	1/8
		-	14	D	+	+	+	+	+	+	1/8
			15	D	+	+	+	+	+	+	1/8

特開昭59-20226(7)

3	エンテロトキシン およびペロ細胞毒 と 線毛	+	16	O	-----	1/2
			17		-----	1/2
			18	D	-----	1/2
			19		-----	1/2
	A+D (LT)(K88) (ST)(K99) (VT)987P	-	20	O	- + + + + + + + +	1/2
			21		+ + + + + + + + +	1/2
			22	D	- - + + + + + + +	1/2
			23		- + + + + + + + +	1/2

A, B, C, D, は用いたワクチンおよび攻撃用菌株である。

A エンテロトキシン および ペロトキシン	{	O-5	(020 a b : K? LT <sup>+</sup> )
		O-153	(0147 : K? LT <sup>+</sup> ST <sup>+</sup> )
		O-112	(0? : K91 VT <sup>+</sup> )
B 線毛	{	V-50	(010 : KV50, K88 <sup>+</sup> 987P <sup>+</sup> )
		O-126	(0114 : K90, 99 <sup>+</sup> )
		O-72	(09 : K60 987P <sup>+</sup> )
C エンテロトキシン および ペロトキシン	{	Abbotstown	(0149 : K91, 88ac LT <sup>+</sup> ST <sup>+</sup> VT <sup>+</sup> )
		P16	(09 : K9 ST <sup>+</sup> VT <sup>+</sup> )

ンとペロ細胞毒および線毛ワクチンのそれぞれを上述の混合ワクチンとはほぼ同様の条件下でそれぞれ7および9頭の母豚に接種した後出生した62および81頭の分娩子豚について観察したところ、両者共に22%のものが下痢を発症した。明らかに無処置対照群の40.9%の発生率とは異なっており、それぞれのワクチンの効果が認められるものの上述した混合ワクチンにはかなり劣る成績であった(第2表)。

第2表

エンテロトキシン(LT, ST)およびペロ細胞毒、線毛(K88, K99, 987P)およびこれらの混合ワクチンを用いた哺乳子豚の大腸菌性下痢症予防の野外試験

ワクチンの区分		供試数		発生数(%)	
		母豚	分娩子豚	下痢	死亡
対照群	混合ワクチン	19	166	19(11.4)	0
	エンテロトキシン およびペロ細胞毒	7	62	14(22.6)	0
	線毛	9	81	18(22.2)	2(2.4)
	無処置	5	44	18(40.9)	4(9.1)

D V17 K V17<sup>+</sup> LT<sup>-</sup> ST<sup>-</sup> VT<sup>-</sup> K88<sup>+</sup> K99<sup>+</sup>  
線毛 O-15 (010 : K V50<sup>+</sup> LT<sup>-</sup> ST<sup>-</sup> VT<sup>-</sup> 987P<sup>+</sup>)

#### 実施例3

実施例2の実験的研究の成果を実施例3ではそれを野外試験(台湾省苗栗養豚センター)によって確認しようとしたものである。

実施例1で得られたワクチン10mlずつを分娩予定のほぼ1か月前の妊娠母豚19頭に2週間おきに2回耳根部の筋肉内に注射した。上記のセンターにおける母豚のLT抗体はX2~4であった。無処置対照として同様の母豚5頭には生理食塩水を供試ワクチンと同量注射した。第2表に示すように出生子豚数は混合ワクチン接種群166頭、無処置対照群44頭であった。これらの内、混合ワクチン接種群は生後7日目までに19頭(11.4%)の下痢が発生したが、死亡例は0であったのに対し、無処置対照群では生後7日目までに18頭(40.9%)の下痢が発生し、内4頭が死亡した。

これに対し、実施例1で用いたエンテロトキシン

この成績から、野外試験でも本発明ワクチンの下痢予防効果が確認された。なお、混合ワクチン接種群と無処置対照群の体重増加率を見ると混合ワクチン接種群のほうが生育が良好であることが判った。また、両群とも下痢の原因菌となつたE. coliは08 : K91, LT<sup>+</sup>, 987Pであった。

#### 実施例4

実施例1で得られた混合ワクチンを生後1~15か月令の離乳期の子豚の耳根部筋肉内に2週間おきに5mlずつ2回注射し、2回注射後1か月間観察した。その成績を第3表に示した。使用した子豚は苗栗養豚センターのもので、母豚にはワクチンは投与されていない。対照群に比べ下痢の発生率はかなり低く、本発明ワクチンの効果が確認された。

第3表

エンテロトキシン(LT, ST)およびペロ細胞毒と線毛(K88, K99, 987P)を用いた混合ワクチンによる離乳期子豚\*の下痢予防の野外試験

区 分	供 試 数	発 生 数** (%)	
		下 痢	死 亡
混合ワクチン群	148	7 (4.7)	0
対 照 群	88	14 (15.9)	3 (3.4)

\* 生後 1 ～ 1.5 か月

\*\* 観 察 1 か月